

PATRÍCIA RICARDINO DA SILVEIRA

**RESPOSTAS OXIDATIVAS E ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS EM
TOMATEIRO INFECTADO POR *Xanthomonas gardneri***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

S587r
2012

Silveira, Patrícia Ricardino da, 1986-

Respostas oxidativas e alterações fisiológicas em tomateiro infectado por *Xanthomonas gardneri* / Patrícia Ricardino da Silveira. – Viçosa, MG, 2012.

ix, 34f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: José Rogério de Oliveira

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 23-28

1. *Xanthomonas gardneri*. 2. Tomate – Doenças e pragas. 3. Mancha-bacteriana. 4. Fluorescência. 5. Fotossíntese. 6. Clorofila. 7. Enzimas. 8. Stress oxidativo. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

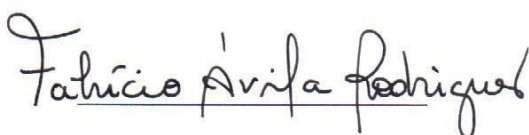
CDD 22. ed. 579.33

PATRÍCIA RICARDINO DA SILVEIRA

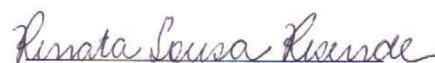
**RESPOSTAS OXIDATIVAS E ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS EM
TOMATEIRO INFECTADO POR *Xanthomonas gardneri***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 24 de julho de 2012.



Fabrício de Ávila Rodrigues



Renata Sousa Resende



José Rogério de Oliveira

(Orientador)

*Aos meus pais, Enir Aparecida Ricardino Silveira
e Delson Ribeiro da Silveira e a minha irmã,
Daniela.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo, por sempre estar ao meu lado em todos os momentos me animando e dando forças para seguir. À Maria Santíssima pela proteção constante.

Aos meus pais, pelo imenso apoio e amor em todas as horas. À minha querida irmã e aos meus avós queridos.

Ao professor José Rogério pela orientação e confiança.

Ao professor Fabrício de Ávila Rodrigues pela orientação, confiança e paciência.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo.

Aos amigos do laboratório, Kelly pela grande ajuda e paciência na realização das análises enzimáticas e a Maria, Hélivio, Jonas, Renata, Wiler, Wilka, Leonardo, Daniel, Carlos, Lívio e Gilcianny pela amizade e pela boa vontade e disponibilidade em ajudar sempre que precisei.

Às grandes amigas da república Eliane, Cíntia, Lorena e Milena pelo apoio. À querida amiga Camila pela amizade, incentivo e companheirismo e à amiga Edneya que sempre torceu por mim.

Aos colegas de mestrado especialmente a Deiziane, Denise e Brenda pelo apoio nos estudos e pela amizade.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, principalmente ao Bruno, Macabeu e à querida amiga Sueli pela imensa força e compreensão.

BIOGRAFIA

Patrícia Ricardino da Silveira, filha de Delson Ribeiro da Silveira e Enir Aparecida Ricardino Silveira, nasceu em 10 de janeiro de 1986 em Lavras - MG.

Iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil, em março de 2005, recebendo o grau de Engenheira Agrônoma em janeiro de 2010, pela mesma instituição.

Em agosto de 2010, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em 24 de julho de 2012.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	6
Crescimento do tomateiro	6
Obtenção do isolado de <i>Xanthomonas gardneri</i> e inoculação do tomateiro.....	6
Determinação das atividades das enzimas: peroxidases (POX, EC 1.11.1.7), ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), glutatona peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9) e redutase da glutatona (GR, EC 1.11.1.6).....	7
Determinação das concentrações de aldeído malônico (MDA), peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) e superóxido (O ₂ ⁻).....	9
Avaliação das trocas gasosas	10
Determinação das concentrações de clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> e de carotenoides.....	11
Avaliação dos parâmetros e da imagem de fluorescência da clorofila <i>a</i>	11
Delineamento experimental e análise estatística dos dados.....	12
RESULTADOS	13
Atividade das enzimas POX, APX, CAT, SOD, GPX e GR	13
Concentrações de aldeído malônico (MDA), peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) e superóxido (O ₂ ⁻).....	13
Concentrações de clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> e de carotenoides.....	14
Trocas gasosas	14
Parâmetros e imagens de fluorescência da clorofila <i>a</i>	15
DISCUSSÃO	18
REFERÊNCIAS.....	23

RESUMO

SILVEIRA, Patrícia Ricardino, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Respostas oxidativas e alterações fisiológicas em tomateiro infectado por *Xanthomonas gardneri***. Orientador: José Rogério de Oliveira.

A mancha bacteriana causada por *Xanthomonas gardneri* é uma das doenças mais importantes da cultura do tomateiro e é capaz de afetar a produção de tomate, principalmente para processamento industrial. Este trabalho teve o objetivo de verificar as possíveis alterações bioquímicas e fisiológicas em plantas de tomateiro da cultivar Santa Clara infectadas por *X. gardneri*. Para isto foi determinada a atividade de importantes enzimas do sistema antioxidativo, além de alguns metabólitos. As principais enzimas quantificadas foram a peroxidase (POX), a ascorbato da peroxidase (APX), a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD), a peroxidase da glutationa (GPX) e a redutase da glutationa (GR). Foram avaliadas as concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido (O_2^-) e aldeído malônico (MDA). Também foram determinados parâmetros relacionados às trocas gasosas e à fluorescência da clorofila *a*, bem como a concentração de pigmentos fotossintéticos e imagens de fluorescência da clorofila *a*. De uma maneira geral, a atividade das enzimas quantificadas foi significativamente maior para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas em quase todos os dias após inoculação (dai), com exceção da GPX e da GR que apresentaram maior atividade significativa somente no último dai. As concentrações de MDA e O_2^- foram significativamente maiores para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas aos 6, 9 e 18 dai e a concentração de H_2O_2 aos 9 e 18 dai. As concentrações de clorofila *a* e clorofila *b* foram significativamente menores para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas aos 6, 9, 12 e 15 dai e a concentração de carotenoides aos 9, 12 e 15 dai. Todos os parâmetros relacionados às trocas gasosas foram significativamente menores para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas em todos os dai. Os parâmetros da fluorescência da clorofila *a* também apresentaram significativas alterações. O rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m) e a taxa de transporte de elétrons (ETR) foram significativamente menores para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas durante todos os dai. A fluorescência inicial (F_0) e o quenching não-

fotoquímico (NPQ), foram significativamente maiores para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas durante todos os dias e aos 3, 9 e 12 dias, respectivamente. O rendimento quântico efetivo do fotossistema II (F'_v/F'_m) foi significativamente menor para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas aos 9, 12 e 15 dias e o quenching fotoquímico (qP) aos 3, 6, 12 e 15 dias. Em relação às imagens de fluorescência da clorofila *a* pôde-se observar uma nítida alteração nas imagens dos parâmetros com o progresso da mancha bacteriana. Essas alterações puderam ser verificadas devido a mudanças no padrão de cores das imagens.

ABSTRACT

SILVEIRA, Patrícia Ricardino, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **Oxidative responses and physiological changes in tomato plants infected by *Xanthomonas gardneri*.** Advisor: José Rogério de Oliveira.

The bacterial spot caused by *Xanthomonas gardneri* is one of the most important diseases of tomato crop and is able to affect the production of tomatoes, mainly for industrial processing. This study aimed to determine possible biochemical and physiological changes in tomato plants cultivar Santa Clara infected *X. gardneri*. For it was determined the activity of key enzymes of the antioxidant system, and some metabolites. The main enzymes were quantified peroxidase (POX), the ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR). We evaluated the concentrations of hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide (O_2^-) and malondialdehyde (MDA). Were also determined parameters related to the gas holes and chlorophyll fluorescence and the pigments and the concentration of chlorophyll fluorescence images *a*. De general, the enzyme activity was quantified significantly higher plants inoculated with respect to uninoculated plants in almost every day after inoculation (dai), except for GPX and GR showed that significantly more activity only in the last dai. The concentrations of MDA and O_2^- were significantly higher for the inoculated plants compared to uninoculated plants at 6, 9 and 18 dai and the concentration of H_2O_2 to give 9 and 18 dai. The concentration of chlorophyll *a* and chlorophyll *b* were significantly lower for the inoculated plants in comparison to plants not inoculated at 6, 9, 12 and 15 therefrom and the concentration of carotenoids to 9, 12 and 15 there from. All parameters related to gas exchange were significantly lower for plants inoculated compared to uninoculated plants in all dai. The parameters of chlorophyll fluorescence also showed significant changes. The maximum quantum yield of photosystem II (F_v / F_m) and electron transport rate (ETR) were significantly lower for plants inoculated compared to uninoculated plants during all dai. The initial fluorescence (F_0) and non-photochemical quenching (NPQ) were significantly higher for the inoculated plants compared to uninoculated plants during all dai and 3,

9 and 12 dai, respectively. The effective quantum yield of photosystem II (F_v^2/F_m^2) was significantly lower for plants inoculated compared to uninoculated plants at 9, 12 and 15 dai and photochemical quenching (qP) at 3, 6, 12 e 15 dai. In relation to the images of chlorophyll fluorescence could be observed a clear change in the parameters of the images with the progress of bacterial spot. These changes could be verified due to changes in the pattern of color images.

INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma planta originária da região andina da América do Sul. Primeiramente foi domesticado no México e introduzido na Europa no século XVII, de onde foi disseminado para o restante do continente europeu. No final deste mesmo século, chegou também na Ásia, África e Oriente Médio (Santos e Barbosa, 2011). O tomateiro pertence à família botânica das solanáceas e é uma planta herbácea e cultivada predominantemente como cultura anual (Jones et al., 1993).

A produção mundial de tomate no ano de 2009 foi de 151.151.088 t, a China é o maior país produtor com 45.365.543 t seguida pelos Estados Unidos com 14.141.900 t e Índia com 11.148.800 t. O Brasil, neste mesmo ano, ocupou a nona posição com uma produção de 4.310.480 t. A área total da produção mundial foi de 4.340.147 ha. A China apresentou a maior área colhida com 920.803 ha, novamente seguida pelos Estados Unidos e Índia com 175.440 ha e 599.100 ha, respectivamente. A área colhida do Brasil foi de 67.605 ha (Agrianual, 2012).

Ainda de acordo com dados do Agrianual (2012), a principal região brasileira produtora de tomate no ano de 2011 foi o Sudeste, com uma produção de 1.461.802 t em uma área total de 65.262 ha, onde se destacam os Estados São Paulo com 651.256 t e Minas Gerais com 480.069 t. O Centro-Oeste com produção de 1.406.058 t também possui grande importância na produção nacional devido principalmente ao Estado de Goiás que produziu 1.384.181 t no ano de 2011, destacando-se como o principal Estado produtor. A produção das demais regiões brasileiras em 2011 foi de 662.795 t no Sul, 566.473 t no Nordeste e 6.307 t no Norte.

Diante dos vários fatores que limitam a produtividade do tomateiro, as doenças ocupam uma posição importante, principalmente quando cultivares resistentes a numerosas doenças não são plantados (Jones et al., 1993). Dentre as diversas doenças que diminuem a produção do tomateiro, as de etiologia bacteriana são de grande importância, com destaque para as causadas por bactérias do gênero *Xanthomonas*.

A mancha bacteriana foi observada pela primeira vez na África do Sul em 1914 e descrita como cancro do tomate por Ethel Doidge em 1920. Praticamente ao mesmo tempo, uma doença semelhante foi descrita por Gardner e Kendrick nos Estados Unidos em 1921, onde recebeu o nome de mancha bacteriana (Jones et al., 1998). O patógeno causador da mancha bacteriana passou por uma série de classificações desde o seu primeiro relato e atualmente, de acordo com uma reclassificação proposta por Jones et al., (2004), bactérias do grupo *Xanthomonas* pertencem a quatro diferentes espécies: *X. euvesicatoria*, *X. perforans*, *X. vesicatoria* (Doidge) e *X. gardneri* (Sutic). Embora se tratem de espécies distintas (Jones et al., 2004), essas manifestam o mesmo quadro sintomatológico em tomateiro (Lopes e Quezado-Duval, 2005).

O primeiro relato da mancha bacteriana no Brasil ocorreu no ano de 1959, em regiões produtoras de tomate do Estado de São Paulo (Rodrigues Neto et al., 1984) e o primeiro surto causado por *X. gardneri* em tomate para processamento industrial em regiões produtoras do centro-oeste (Quezado-Duval et al., 2004).

Os sintomas da mancha bacteriana podem ocorrer em toda a parte aérea do tomateiro (Good e Sasser, 1980). Geralmente as lesões são amarronzadas e circulares e em condições de elevada umidade apresentam aspecto encharcado. Raramente as lesões atingem diâmetro superior a 3 mm (Jones et al., 1993). Quando as condições são ótimas para o desenvolvimento da doença, as manchas podem coalescer formando longas estrias escuras. Um amarelecimento generalizado pode ocorrer nos folíolos com muitas lesões (Jones et al., 1993).

As condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento da mancha bacteriana são temperaturas entre 24 e 30°C e alta precipitação (Jones et al., 1993). No entanto, em estudo realizado por Araújo (2010), a espécie *X. gardneri* foi mais agressiva a 20°C quando comparada a *X. euvesicatoria*, *X. perforans* e *X. vesicatoria* sob a mesma temperatura.

As plantas quando expostas às condições de estresse abiótico e/ou biótico são capazes de induzir uma rápida produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais podem causar danos celulares e também atuar como sinalizadoras de respostas ao estresse (Resende et al., 2003). Normalmente no metabolismo da planta ocorre a produção de ERO, porém em condições de estresse ocorre um desequilíbrio entre a produção e eliminação das mesmas (Mittler, 2002; Neill et al., 2002). As ERO são

também responsáveis por danos que levam a peroxidação de lipídeos das membranas celulares e o acúmulo de MDA (Mittler, 2002; Lamb e Dixon, 1997).

As principais formas de ERO geradas durante a explosão oxidativa tem origem no oxigênio molecular (O_2) que, ao sofrer redução parcial através de uma sucessiva adição de elétrons, é capaz de gerar peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido (O_2^-) e radical hidroxila livre (OH^-) (Resende et al., 2003). Estudos recentes têm demonstrado que o H_2O_2 atua como sinalizador de respostas em plantas expostas ao estresse tanto abiótico quanto biótico e é capaz de agir diretamente sobre os patógenos (Neill et al., 2002; Wojtaszek, 1997). A capacidade de movimentação celular do H_2O_2 deve-se ao fato desse não possuir cargas podendo, assim, translocar-se livremente entre as membranas das células (Resende et al., 2003).

Como objetivo de amenizar os danos causados pelo excesso de ERO, as plantas desenvolveram mecanismos de remoção dessas espécies reativas por meio da produção de compostos enzimáticos e não enzimáticos (Apel e Hirt, 2004). O sistema antioxidante não enzimático envolve compostos como a glutathiona, o ascorbato, os tocoferóis, os flavonóides, os alcalóides e os carotenóides (Apel e Hirt, 2004). Já o sistema antioxidante enzimático envolve uma série de enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a peroxidase (POX), a ascorbato da peroxidase (APX), a peroxidase da glutathiona (GPX) e a redutase da glutathiona (GR). A SOD é a primeira a atuar promovendo a dismutação do ânion O_2^- para H_2O_2 , o qual é posteriormente detoxificado pelas enzimas CAT, GPX, APX e POX e GR. A APX, em sua primeira reação de catalização, usa o ascorbato como agente redutor, gerando H_2O e MDA (Apel e Hirt, 2004).

Vários relatos na literatura têm mostrado distúrbios fisiológicos envolvendo alterações fotossintéticas em plantas infectadas por fungos (Shtienberg, 1992; Lorenzini et al., 1997; Jesus Junior et al., 2001), bactérias (Ribeiro, 2002) e vírus (Guo et al., 2005). Em decorrência do processo infeccioso desses patógenos, ocorrem alterações na taxa líquida de assimilação de carbono (A), na condutância estomática (g_s), na relação da concentração interna e externa de carbono (C_i/C_a) e na taxa de transpiração (E) como relatado em trabalhos realizados pelos autores acima citados.

A análise da fluorescência da clorofila a tem sido uma importante ferramenta em estudos que mostram alterações em plantas expostas a condições ambientais de estresse, principalmente por se tratar de uma técnica não invasiva, não destrutiva e

sensível, capaz de fornecer um diagnóstico pré-sintomático e mostrar alterações no aparato fotossintético de plantas infectadas por patógenos (Krause e Weiz, 1991; Rolfe e Scholes, 2010).

Os pigmentos fotossintéticos responsáveis pela captura da energia luminosa nas plantas são os carotenóides e as clorofilas *a* e *b*, sendo o tipo *a* mais amplamente distribuído. As clorofilas estão presentes nos fotossistemas I (FSI) e II (FSII) e quando absorvem a energia luminosa adquirem um estado de excitação, tornando-se momentaneamente instáveis. Esse excesso de energia absorvido deve ser liberado para que as clorofilas retornem ao seu estado base. Existem quatro formas de dissipação desta energia as quais são: a reemissão de fótons, processo este conhecido como fluorescência; a conversão do excesso de energia em calor; a transferência de energia quando uma molécula excitada é capaz de transferir sua energia para outra molécula e finalmente o processo fotoquímico, onde o excesso de energia provoca a ocorrência das reações fotoquímicas da fotossíntese (Taiz e Zeiger, 2009).

Sob condições normais, as plantas direcionam a maior parte da energia absorvida pelos pigmentos fotossintéticos para os processos fotoquímicos da fotossíntese; porém quando são expostas ao estresse, diminuem sua eficiência fotossintética e esta se reflete em alterações no aparato fotossintético e no aumento da fluorescência da clorofila *a* (Lichtenthaler e Miehé, 1997). Caso a energia luminosa absorvida seja maior do que a capacidade de utilização nos processos fotoquímicos, os mecanismos de fotoproteção e fotoinibição serão ativados (Demmig-Adams, 1992).

Redução na eficiência fotossintética pode ocorrer devido a ação de mecanismos fotoprotetores que amenizam o excesso de excitação causado pela menor dissipação de energia através do transporte de elétrons (ETR), o que acarreta um aumento do quenching não-fotoquímico (NPQ) e diminuição do rendimento quântico máximo (F_v/F_m) e do rendimento quântico efetivo (F^2/F^2_m) do FSII (Demmig-Adams, 1992). A ocorrência de processos fotoinibitórios indica que a capacidade de fotoproteção foi excedida, o que pode levar a um declínio em F_v/F_m (Araújo e Deminiciis, 2009). Os parâmetros quenching fotoquímico (qP) e fluorescência inicial (F0) também podem ser afetados como observado em trabalhos realizados por Alves et al., (2011) e Nógues et al., (2002).

Atualmente, a análise da imagem da fluorescência da clorofila *a* tem sido bastante utilizada em pesquisas envolvendo plantas sob estresse biótico, pois diferente da técnica que não utiliza imagens, onde as mensurações são pontuais, essa técnica proporciona uma maior homogeneidade na avaliação dos parâmetros da fluorescência relacionados à fotossíntese (Gorbe e Catalayude, 2012).

Embora os estudos sobre fluorescência de imagem da clorofila *a* tenham apresentado avanços, pouco são os trabalhos com patógenos bacterianos foliares. As poucas pesquisas existentes concentram-se principalmente em patovares biotróficos e hemibiotróficos de *Pseudomonas syringae* e abordam o uso da fluorescência de imagem para diagnósticos pré-sintomáticos e possíveis alterações no metabolismo do hospedeiro. Como a resposta hipersensitiva (HR) é um mecanismo de defesa comum e efetivo contra patógenos biotróficos, comparações também têm sido feitas entre isolados virulentos e avirulentos de *Pseudomonas syringae* em plantas de *Arabidopsis thaliana* (Rolfes e Scholes, 2010).

Frente a tais informações e à falta de estudos bioquímicos e fisiológicos em tomateiro infectado por *X. gardneri*, os objetivos deste trabalho foi verificar as possíveis alterações no metabolismo do estresse oxidativo, na fotossíntese e nos parâmetros da fluorescência da clorofila *a* na interação tomateiro-*X. gardneri*.

MATERIAL E MÉTODOS

Crescimento do tomateiro:

Sementes de tomateiro da cultivar Santa Clara foram semeadas em vasos de plástico contendo 2 kg de substrato Topstrato HT (Vida Verde, Mogi Mirim, SP). Para cada quilo de substrato, foi adicionado 1,63 gramas de fosfato de cálcio monobásico e, em seguida, 4 sementes de tomate foram semeadas em cada vaso. Após emergência, efetuou-se o desbaste deixando-se apenas uma planta por vaso. As plantas foram adubadas quinze dias após semeadura com 50 ml de solução nutritiva contendo, em mg L⁻¹, 192 de KCl, 104,42 de K₂SO₄, 150,35 de MgSO₄.7H₂O, 61 de uréia, 0,27 de NH₄MO₇O₂₄.4H₂O, 1,61 de H₃BO₃, 6,67 de ZnSO₄, 1,74 de CuSO₄.5H₂O e 4,10 de MnCl₂.4H₂O, 4,08 de FeSO₄.7H₂O e 5,58 de EDTA bissódico. Essa solução foi aplicada semanalmente e as plantas irrigadas diariamente.

Obtenção do isolado de *Xanthomonas gardneri* e inoculação do tomateiro:

O isolado de *X. gardneri* foi obtido da coleção de culturas de fitobactérias do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil. O isolado, preservado em freezer -80 °C, foi repicado e cultivado em meio Kado 523 (Kado e Heskett, 1970) por 48 h na temperatura de 28 °C.

Para o preparo do inóculo, placas de Petri com meio Kado 523 solidificado foram semeadas com 200 µL de suspensão bacteriana, a qual foi cultivada inicialmente em meio de cultura 523 líquido. A suspensão foi espalhada no meio sólido com o auxílio de uma alça de Drigalsk. As placas foram incubadas por 48 h na temperatura de 28 °C. Após este período, foi adicionada água de torneira nas placas de Petri contendo o crescimento bacteriano. A suspensão bacteriana obtida foi ajustada em espectrofotômetro para OD₅₄₀ = 0,3 (5 × 10⁸ UFC/mL).

As plantas foram inoculadas com a suspensão bacteriana utilizando um atomizador De Vilbs nº 15 aos 38 dias após semeadura, quando apresentavam de 5 a 6 folhas completamente expandidas. Após inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h de luz. Às 24 h

após inoculação, as plantas foram transferidas para casa de vegetação com temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ onde permaneceram até a finalização do experimento.

Determinação das atividades das enzimas: peroxidases (POX, EC 1.11.1.7), ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), glutathiona peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9) e redutase da glutathiona (GR, EC 1.11.1.6):

Amostras da segunda, terceira e quarta folha das plantas de tomateiro, não inoculadas e inoculadas com *X. gardneri*, foram coletadas aos 3, 6, 9 e 18 dias após inoculação (dai). As amostras foram colocadas individualmente em embalagens de papel alumínio e rapidamente congeladas em nitrogênio (N_2) líquido. Em seguida, as amostras foram armazenadas em ultrafreezer a -80°C para posterior análise.

Para a obtenção do extrato foliar para determinar a atividade das enzimas POX, APX, CAT, SOD e GPX, 0,3 g de fragmentos de folhas foram macerados com N_2 líquido em almofariz até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8) contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVP) 2% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a $12.000 \times g$ por 15 min a 4°C e o sobrenadante foi dividido em alíquotas que foram usadas como extrato para as determinações enzimáticas.

Para a obtenção do extrato foliar para determinar a atividade da enzima GR, 0,3 g de fragmentos foliares foram macerados conforme descrito acima. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo EDTA 0,1 mM, *DL*-ditioteitol 1 mM, PMSF 1 mM e PVP 2% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado conforme descrito anteriormente.

A atividade da POX foi determinada pela oxidação do pirogalol, de acordo com a metodologia proposta por Kar e Mishra (1976). A mistura de reação foi constituída de tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 6,8), pirogalol 20 mM e H_2O_2 20 mM em um volume de 2 mL. A reação foi iniciada pela adição de 25 μL do extrato foliar e a atividade foi determinada pelo consumo de H_2O_2 a 420 nm, durante 1 min a 25°C . O coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Chance e

Maehley, 1955) foi usado para calcular a atividade da POX, a qual foi expressa em μM de purpurogalina produzida $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da APX foi determinada pelo método de Nakano e Asada (1981). A mistura de reação foi constituída de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8), H_2O_2 1 mM e ascorbato 0,8 mM em um volume de 2 mL. A reação foi iniciada pela adição de 20 μL do extrato foliar e a atividade foi medida pela oxidação do ascorbato a 290 nm, durante 1 min a 25°C. O coeficiente de extinção molar de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Nakano e Asada, 1981) foi usado para calcular a atividade da APX, a qual foi expressa em $\mu\text{M min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da CAT foi determinada pelo método de Cakmak e Marschner (1991). A mistura de reação foi constituída de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8) e de H_2O_2 100 mM em um volume de 2 mL. A reação foi iniciada pela adição de 70 μL do extrato foliar e a atividade foi determinada pelo consumo de H_2O_2 a 240 nm durante 1 min a 25°C. O coeficiente de extinção molar de $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Anderson et al., 1995) foi usado para determinar a atividade da CAT, a qual foi expressa em $\text{mM min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da SOD foi determinada pela adição de 25 μL do extrato foliar em 1,975 mL de mistura de reação constituída de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8), metionina 13 mM, azul de *p*-nitro-tetrazólio (NBT) 75 μM , EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 μM (Del Longo et al., 1993). A reação ocorreu a 25°C sob iluminação de lâmpadas de 15 W. Após 10 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotoredução do NBT, foi medida em espectrofotômetro utilizando-se a absorbância de 560 nm (Giannopolitis e Ries, 1977). As amostras controle tiveram suas absorbâncias medidas a 560 nm utilizando-se mistura de reação mantida no escuro por 10 min. Os valores obtidos foram subtraídos das leituras das amostras das repetições dos tratamentos que receberam iluminação. Uma unidade da SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a fotoredução do NBT em 50% (Beauchamp e Fridovich, 1971).

A atividade da GPX foi determinada pela adição de 100 μL do extrato foliar ao meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, (pH 7,0), EDTA 1 mM, NaCl 0,114 M, GSH 1 mM, NADPH 0,2 mM, H_2O_2 0,25 mM e 1

unidade de redutase da glutatona (Nagalakshmi e Prasad, 2001). O decréscimo na absorbância foi medido a 340 nm a 30°C durante o primeiro minuto de reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹ (Anderson e Davis, 2004) e expressa em μM min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

A atividade da GR foi determinada pela adição de 100 μL do extrato foliar a 1,9 mL de uma mistura de reação constituída de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, glutatona oxidada (GSSG) 1 mM e NADPH 0,1 mM preparado em tampão Tris-HCl 0,5 mM (pH 7,5) de acordo com Carlberg e Mannervik (1985). O decréscimo na absorbância foi medido a 340 nm a 30°C durante o primeiro minuto de reação. A atividade da GR foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹ (Foyer e Halliwell, 1976) e expressa em μM min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

Determinação das concentrações de aldeído malônico (MDA), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e superóxido (O₂⁻):

Amostras da segunda, terceira e quarta folha das plantas de tomateiro, não inoculadas e inoculadas com *X. gardneri* foram coletadas aos 3, 6, 9 e 18 dai. As amostras foram colocadas individualmente em embalagens de papel alumínio e rapidamente congeladas em N₂ líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80°C para posterior análise. A determinação da absorbância de MDA e O₂⁻ foi realizada em espectrofotômetro enquanto que para o H₂O₂ as leituras foram realizadas em um leitor de placas de ELISA (modelo ASYS UVM 340).

Para a determinação da concentração de MDA, amostras de 200 mg de tecido foliar foram maceradas em N₂ líquido em almofariz até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL constituído de ácido tricloroacético (TCA) 1% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 12000 × g, durante 15 min a 4 °C. Após centrifugação, 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado a 1,5 mL da solução de ácido tiobarbitúrico 0,5% (m/v) (preparado em 20% (m/v) de TCA) e incubado em banho-maria a 95°C por 30 min. Após esse período, a reação foi parada em banho de gelo. As amostras foram centrifugadas a 9000 × g por 10 min e a absorbância específica do sobrenadante foi determinada a 532 nm. A absorbância inespecífica foi mensurada a 600 nm e subtraída do valor da absorbância específica. A concentração

de MDA foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e foi expressa em $\mu\text{mol kg}^{-1}$ de massa fresca (Heath e Packer, 1968).

Para a determinação da concentração de O_2^- , seguiu-se a metodologia de Chaytanya e Naithani (1994). Amostras de 200 mg de tecido foliar foram maceradas em N_2 líquido em almofariz até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL constituído de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,2) contendo 1 mM de dietil ditiocarbamato para inibir a atividade SOD. O homogeneizado foi centrifugado a $22.000 \times g$ durante 20 min a 4°C . Foram adicionados 300 μL do sobrenadante ao meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,2) contendo 1 mM de dietil ditiocarbamato e NBT 0,25 mM. O ânion O_2^- foi mensurado pela capacidade de redução do NBT. A absorbância do produto final foi mensurada a 540 nm e a formação do ânion O_2^- expressa em $\Delta A_{540} \text{ g}^{-1}$ de massa fresca.

Para a determinação da concentração de H_2O_2 , amostras de 200 mg de tecido foliar foram maceradas em N_2 líquido em almofariz até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,5) e hidroxilamina 1 mM. O homogeneizado foi centrifugado a $10.000 \times g$ durante 15 min, a 4°C (Kuo e Kao, 2003). Foram adicionados 100 μL do sobrenadante ao meio de reação constituído de $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)$ 100 μM , ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250 μM e sorbitol 100 mM em um volume de 2 mL (Gay e Gerbicki, 2000). As amostras foram mantidas no escuro por 30 min e a absorbância determinada a 560 nm. A concentração de H_2O_2 , estimada com base em curva padrão de H_2O_2 , foi expressa em $\mu\text{mol kg}^{-1}$ de massa fresca.

Avaliação das trocas gasosas:

As avaliações dos parâmetros relacionados às trocas gasosas foram realizadas no período da manhã das 9:00 às 12:00 horas utilizando-se um analisador de gás por infravermelho portátil (IRGA, Li-Cor, modelo LI-6400 Nebraska, EUA) com câmara subestomática de 6 cm^2 em sistema aberto. Os parâmetros avaliados foram: g_s , E , A e a relação da concentração interna (C_i) e ambiente de CO_2 (C_i/C_a). As mensurações foram realizadas em casa de vegetação onde as concentrações de CO_2 variaram entre 380 a 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ sob radiação fotossinteticamente ativa de 1000

$\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. As medi\u00e7\u00f5es foram feitas aos 3, 6, 12 e 15 dai nos dois fol\u00edolos previamente marcados da terceira e da quarta folha, a partir da base, das plantas das repeti\u00e7\u00f5es de cada tratamento. Os mesmos fol\u00edolos foram utilizados em todas as avalia\u00e7\u00f5es e as leituras foram registradas apenas quando os valores de A e g_s tornaram-se est\u00e1veis.

Determina\u00e7\u00e3o das concentra\u00e7\u00f5es de clorofila a , clorofila b e de carotenoides:

Aos 3, 6, 9, 12 e 15 dai foram coletados dez discos de 10 mm de di\u00e2metro dos fol\u00edolos da segunda, terceira e quarta folha a partir da base, das plantas das repeti\u00e7\u00f5es de cada tratamento. Os discos foram colocados em recipientes de vidro com capacidade de 10ml, contendo 5 mL de dimetilsulf\u00f3xido saturado com carbonato de c\u00e1lcio. Ap\u00f3s 24h \u00e0 temperatura de 25\u00b0C, as amostras foram quantificadas espectrofotometricamente a 470, 649,1 e 665,1 nm em espectrofot\u00f4metro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) e as concentra\u00e7\u00f5es de clorofilas a , b e de carotenoides expressas em $\mu\text{g cm}^{-2}$.

Avalia\u00e7\u00e3o dos par\u00e2metros e da imagem de fluoresc\u00eancia da clorofila a :

Foi utilizado o fluor\u00f4metro Imaging-PAM (modelo IMAG - MAX/L) e o software Imaging Win (Heinz Walz, Effeltrich, Alemanha) para obten\u00e7\u00e3o dos par\u00e2metros e das imagens de fluoresc\u00eancia da clorofila a . As plantas inoculadas e n\u00e3o inoculadas com *X. gardneri* foram inicialmente adaptadas ao escuro por 1 hora. Ap\u00f3s este per\u00edodo, quatro fol\u00edolos foram destacados da terceira folha de cada um dos tratamentos plantas inoculados e n\u00e3o inoculadas de cada uma das quatro repeti\u00e7\u00f5es e colocados individualmente na c\u00e2mara CCD para obten\u00e7\u00e3o das imagens resolu\u00e7\u00e3o de 640×480 pixels. A fluoresc\u00eancia inicial (F_0), um par\u00e2metro de escuro, foi o primeiro a ser determinado. Posteriormente, um pulso de luz saturante foi emitido e F_v/F_m foi determinado. Ap\u00f3s exposi\u00e7\u00e3o \u00e0 luz act\u00ednica durante 2 min, os seguintes par\u00e2metros de claro foram determinados: F'_v/F'_m , qP NPQ. A ETR foi determinada posteriormente. Todos os par\u00e2metros foram calculados pelo Software Imaging Win, os quais foram obtidos em seis \u00e1reas pr\u00e9-determinadas na imagem de cada fol\u00edolo. Os par\u00e2metros e as imagens foram obtidos aos 3, 6, 9, 12 e 15 dai.

Delineamento experimental e análise estatística dos dados:

Foram realizados dois experimentos. No primeiro obteve-se as amostras para as análises bioquímicas e no segundo foram realizadas determinações de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*, bem como a concentração de pigmentos. Os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos (plantas inoculadas e não inoculadas) e quatro repetições. Cada unidade experimental, de cada tratamento plantas inoculadas e não inoculadas, foi constituída de um vaso plástico de 2 Kg contendo uma planta. As médias das variáveis relacionadas às enzimas, às trocas gasosas, à fluorescência da clorofila *a* e às concentrações de MDA, H₂O₂ e O₂ e de pigmentos fotossintéticos foram comparadas pelo teste *t* de student ao nível de 5% de probabilidade utilizando-se o software SAS (versão 9.0., SAS Institute Inc., Cary., NC., USA).

RESULTADOS

Atividade das enzimas POX, APX, CAT, SOD, GPX e GR:

A atividade da POX foi significativamente maior para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas aos 6, 9 e 18 dai (Fig. 1A). A atividade aumentou em 38, 44 e 101% aos 6, 9 e 18 dai respectivamente, para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas.

A atividade da enzima APX foi significativamente maior para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas aos 9 e 18 dai (Fig. 1B). A atividade aumentou em 35 e 31% aos 9 e 18 dai respectivamente, para as plantas inoculadas em relação as plantas não inoculadas.

A atividade da CAT foi significativamente maior para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas aos 3, 6, 9 e 18 dai (Fig. 1C). A atividade aumentou em 14, 8, 11 e 48% aos 3, 6, 9 e 18 dai respectivamente, para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas.

A atividade da SOD foi significativamente maior para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas aos 6 e 18 dai (Fig. 1D). Esse aumento foi de 14 e 10% aos 6 e 18 dai respectivamente, para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas.

Tanto a atividade da GPX (Fig. 1E) quanto GR (Fig. 1F) foram significativamente maiores para as plantas inoculadas em relação às não inoculadas somente aos 18 dai. A atividade da GPX aumentou em 16 % e da GR em 119% aos 18 dai para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas.

Concentrações de MDA, H₂O₂ e O₂⁻:

A concentração de MDA foi significativamente maior para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas aos 6, 9 e 18 dai (Fig. 2A). A concentração foi maior em 18, 20 e 22% aos 6, 9 e 18 dai respectivamente para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas.

A concentração de O₂⁻ foi significativamente maior para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas aos 6, 9 e 18 dai (Fig. 2B). Este aumento foi de

56, 41 e 56% aos 6, 9 e 18 dai respectivamente, para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas. A concentração de H_2O_2 foi significativamente maior para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas aos 9 e 18 dai (Fig. 2C). Esta concentração foi maior em 37 e 13% aos 9 e 18 dai respectivamente, para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas.

Concentrações de clorofila *a*, clorofila *b* e de carotenoides:

As concentrações de clorofila *a* (Fig. 3A) e clorofila *b* (Fig. 3B) foram significativamente menores para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas aos 6, 9, 12 e 15 dai. A concentração de clorofila *a* e de clorofila *b* foram menores em 28 e 42% aos 6 dai, 30 e 43% aos 9 dai, 35 e 44% aos 12 dai e 118 e 187% aos 15 dai respectivamente, para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas.

A concentração de carotenoides foi significativamente menor para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas aos 9, 12 e 15 dai (Fig. 3C). A concentração de carotenoides foi menor em 19, 23 e 40% aos 9, 12 e 15 dai respectivamente, para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas.

Trocas gasosas:

Os parâmetros g_s (Fig. 4A), E (Fig. 4B), A (Fig. 4C) e C_i/C_a (Fig. 4D) foram significativamente menores para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas aos 3, 6, 12 e 15 dai.

A g_s , a E e a A foram menores em 94, 37 e 34% aos 3 dai, 113, 94 e 59% aos 6 dai, 182, 158 e 117% aos 12 dai e 350, 300 e 252% aos 15 dai respectivamente, para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas. Assim como os demais parâmetros, a relação C_i/C_a também apresentou redução, porém esta foi bem menor. A redução da relação C_i/C_a foi de 17, 10, 5 e 3% aos 3, 6, 12 e 15 dai respectivamente, para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas.

Parâmetros e imagens de fluorescência da clorofila *a*

O parâmetro F_v/F_m foi significativamente menor para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas aos 3, 6, 9, 12 e 15 dai (Fig. 5A). A redução foi de 31, 10, 7,5, 29 e 68% aos 3, 6, 9, 12 e 15 dai respectivamente, para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas. Já F'_v/F'_m apresentou-se significativamente menor para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas aos 9, 12 e 15 dai (Fig. 5B). A redução observada foi de 57, 140 e 318% aos 9, 12 e 15 dai respectivamente, para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas.

A diferença significativa observada para os parâmetros F0 e NPQ foi maior para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas aos 3, 6, 9, 12 e 15 dai para F0 (Fig. 5C) e aos 3, 9, 12 e 15 dai para NPQ (Fig. 5D). O aumento em F0 foi de 33, 24, 34, 43 e 62 aos 3, 6, 9, 12 e 15 dai respectivamente. Já o parâmetro NPQ aumentou em 31, 19, 12 e 9% aos 3, 6, 9, 12 e 15 dai, respectivamente. A ETR foi significativamente menor para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas aos 3, 6, 9, 12 e 15 dai (Fig. 5E). A redução foi de 33, 36, 36, 166 e 442% aos 3, 6, 9, 12 e 15 dai, respectivamente para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas.

O qP mostrou-se significativamente menor para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas aos 3, 6, 12 e 15 dai (Fig. 5F). A redução observada foi de 60, 36, 73 e 92% aos 3, 6, 12 e 15 dai respectivamente para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas.

As imagens de fluorescência da clorofila *a* demonstram alterações em todos os parâmetros avaliados, as quais podem ser verificadas por meio da mudança de coloração no decorrer do progresso da mancha bacteriana nas plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas (Fig. 6).

A alteração do parâmetro F_v/F_m pode ser verificada pelo clareamento da coloração azul tendendo ao verde. O clareamento da coloração azul já pode ser observado aos 3 dai. Aos 6, 9 e 12 dai, pode-se observar áreas mais claras de tonalidade esverdeada. Já aos 15 dai, onde os sintomas da mancha bacteriana já estavam bem avançados, além das áreas com um verde bastante intenso, observou-se também algumas áreas com coloração avermelhada e outras bastante escuras

indicando ausência de fluorescência da clorofila *a* (Fig. 6). As áreas com coloração azul mais intenso apresentaram valores mais elevados do parâmetro F_v/F_m enquanto que as áreas com azul mais claro tendendo ao verde apresentaram os menores valores.

A alteração do parâmetro F'_v/F'_m pode ser observada com a mudança da coloração amarela e esverdeada nas plantas não inoculadas, para a coloração vermelha e alaranjada nas plantas inoculadas. Aos 3, 6 e 9 dai pode-se observar ainda áreas amareladas, porém com regiões já bastante alaranjadas. Aos 12 e 15 dai foi nítido o predomínio de uma coloração bastante avermelhada com poucas áreas alaranjadas, observando-se também regiões totalmente escurecidas indicando ausência de fluorescência da clorofila *a* (Fig. 6). As áreas amarelas e esverdeadas apresentaram os maiores valores de F'_v/F'_m em relação às áreas vermelhas e laranjas.

Para o parâmetro F_0 , observou-se uma coloração bastante alaranjada nos folíolos das plantas não inoculadas. No entanto, nas plantas inoculadas observou-se um clareamento desta coloração tendendo ao verde em estágios mais avançados da mancha bacteriana. Já aos 3 dai, pode-se observar este clareamento que aumentou ainda mais aos 6, 9 e 12 dai. Aos 15 dai já existiam áreas bastante verdes e outras com início de escurecimento (Fig. 6). As áreas com coloração laranja intensa possuíam os menores valores de F_0 se comparadas com as áreas mais claras e esverdeadas.

A alteração no parâmetro NPQ pôde ser observada com a mudança da coloração verde observada nas plantas não inoculadas para a coloração verde azulada e azul nas plantas inoculadas. Aos 3, 6 e 9 dai ainda ocorreu o predomínio de áreas verdes, porém com aumento da coloração azul. Já aos 12 dai a coloração azul foi predominante. Aos 15 dai, pôde-se observar áreas já bastante escurecidas (Fig. 6). As áreas com coloração verde possuíam os menores valores de NPQ se comparadas às áreas com colorações azuis.

A alteração do parâmetro qP pode ser observada devido a mudança da coloração verdes nos folíolos das plantas não inoculadas para imagens com cores apresentando tons amarelados e alaranjados nos folíolos das plantas inoculadas. Alterações de cor podem ser observadas aos 3, 6 e 9 dai, tornado-se mais acentuadas aos 12 e principalmente aos 15 dai, onde áreas bastante escurecidas já estavam

presentes (Fig. 6). As áreas com coloração verde resultaram nos maiores valores de qP se comparadas às áreas com cores amareladas, alaranjadas e também escurecidas.

DISCUSSÃO

Neste estudo, foi determinada a atividade de algumas importantes enzimas responsáveis pela remoção de ERO durante o processo infeccioso de *X. gardneri* em tomateiro. Na literatura existem poucos relatos sobre a atividade enzimática em plantas infectadas por bactérias do gênero *Xanthomonas* causadoras da mancha bacteriana do tomateiro, como por exemplo, trabalhos realizados por Cavalcanti et al. (2006) e Cavalcanti et al. (2007). Os estudos existentes relacionando patógenos bacterianos com ERO envolvem, em sua maioria, bactérias do gênero *Pseudomonas* e reações de hipersensibilidade (HR) em plantas de fumo ou *Arabidopsis* (Mehdy, 1994). Este seria então o primeiro trabalho a tratar de alterações bioquímicas relacionadas ao estresse oxidativo em plantas de tomateiro infectadas por esta espécie de bactéria.

Os níveis de produção da enzima SOD em plantas são dependentes diretamente da concentração do ânion superóxido (Wang et al., 2004), pois essa atua dismutando este ânion a H_2O_2 . No presente trabalho, ocorreu aumento significativo da atividade da SOD aos 6 e 18 dai. Este aumento na atividade da SOD pode ser considerado uma real evidência da produção de O_2^- como resultante da infecção por *X. gardneri*. Isso foi claramente demonstrado por meio da quantificação deste ânion, o qual apresentou maiores concentrações nas plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas.

Muitos trabalhos na literatura relatam a atividade da SOD em plantas expostas ao estresse biótico e abiótico (Badawi et al., 2004, Fernández-Ocaña et al., 2011; Tang et al., 2006). Em plantas de tomate infectadas por *Xanthomonas vesicatoria*, a atividade da SOD foi maior somente na fase final do progresso da doença (Cavalcanti et al., 2006) enquanto que no trabalho realizado por Kuzniak e Skalodowska (2005), a infecção de folhas de tomateiro por *Botrytis cinerea* resultou em substancial decréscimo da atividade da SOD com o progresso da doença.

A concentração de H_2O_2 neste trabalho manteve-se maior nas plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas. Gayoso et al. (2004) também encontraram resultados semelhantes para a concentração de H_2O_2 em folhas de pimentão infectadas por *Phytophthora capsici*.

As enzimas responsáveis pela remoção do H_2O_2 , principalmente a CAT, acompanharam a elevação da concentração deste composto, o que foi observado pela maior atividade nas plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas.

Neste trabalho, a atividade da CAT manteve-se maior nas plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas durante todas as épocas de avaliação. Já em folhas de tomateiro infectadas por *B. cinerea*, a atividade da CAT mostrou-se elevada nas plantas inoculadas somente nos primeiros dias após a infecção acompanhada de uma queda significativa em relação às plantas não inoculadas (Kuzniak e Skalodowska, 2005).

A enzima POX, também responsável pela remoção do H_2O_2 , não diferente da CAT mostrou maior atividade para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas, principalmente aos 18 dai. Em folhas de plantas de pimentão infectadas por *P. capsici*, resultado semelhante pôde ser observado quando a POX também apresentou um pico de atividade no último dia de avaliação (Gayoso et al., 2004). Em trabalho realizado com tomateiro infectado por *Xanthomonas vesicatoria*, a atividade da POX também foi maior nas plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas (Cavalcanti et al., 2006).

A enzima APX, participante do ciclo ascorbato-glutationa, também é capaz de remover o H_2O_2 assim como a CAT e a POX. Além disso, em sua primeira reação de catalização do H_2O_2 , essa enzima utiliza o ascorbato como agente redutor, gerando MDA, o qual também é produto da peroxidação de lipídeos das membranas celulares (Apel e Hirt, 2004). Desse modo, pode-se sugerir que as maiores concentrações de MDA observadas podem ter sido provenientes tanto da ação da APX quanto da peroxidação dos lipídeos devido à ação das ERO.

A atividade da APX foi superior para as plantas inoculadas, fato este que também corrobora com as maiores concentrações de H_2O_2 . Ainda no trabalho realizado por Cavalcanti et al. (2006), a atividade da SOD foi significativamente maior para as plantas inoculadas com *X. vesicatoria*.

A enzima GPX, participante do ciclo da peroxidase glutaciona, converte o radical H_2O_2 a H_2O utilizando a glutaciona, a qual é gerada pela GR no ciclo da ascorbato glutaciona (Apel e Hirt, 2004). A atividade das duas enzimas só foi maior para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas aos 18 dai. O

aumento na atividade da GPX também foi observado em raízes de tomateiro infectadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi* (Mandal et al., 2008). A atividade da GR em folhas de tomateiro infectadas por *B. cinerea*, diferente do observado neste trabalho, apresentou-se menor para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas (Kuzniak e Sklodowska, 2005).

De uma maneira geral, as concentrações de O_2^- , H_2O_2 e de MDA mostraram-se maiores para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas, evidenciando que realmente a planta reagiu durante o processo infeccioso de *X. gardneri*. Paralelamente a este fato, pôde-se observar que as enzimas do estresse oxidativo determinadas no presente estudo também mantiveram maior atividade nas plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas procurando, deste modo, detoxificar as ERO.

A infecção por *X. gardneri* teve efeito negativo nas trocas gasosas, na fluorescência da clorofila *a* e também na concentração de pigmentos. A *A* foi reduzida nas plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas. Essa redução na fotossíntese certamente reflete os danos ao processo fotossintético ocasionados pela bactéria. A mesma queda da taxa fotossintética foi observada em folhas de *Arabidopsis* inoculadas com isolados virulentos e avirulentos de *Pseudomonas syringae* (Bonfing et al., 2006) e folhas de feijoeiro infectadas por *Phaeoisariopsis griseola* e *Uromyces appendiculatus* (Jesus Junior et al., 2001) e por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Díaz et al., 2001).

A g_s está ligada ao processo difusivo da fotossíntese que compreende a translocação do CO_2 do ar externo até os sítios de carboxilação nos cloroplastos (Marenco e Lopes., 2005). Neste estudo, houve redução da g_s para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas. A *E* também acompanhou a redução observada em g_s . Reduções significativas da g_s e da *E* também foram observadas em folhas de plantas de *Eucalyptus urophylla* infectadas por *Puccinia psidii* (Alves et al., 2011).

Não diferente dos demais parâmetros das trocas gasosas, a relação *Ci/Ca*, também foi menor para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas. A redução da relação *Ci/Ca* pode estar ligada a diminuição da g_s que limita o influxo de carbono atmosférico para os espaços intercelulares da folha e também a limitações

estomáticas. Em trabalho realizado por Lopes e Berger (2001), também houve redução da relação Ci/Ca em folhas de plantas de feijão infectadas por *Uromyces appendiculatus* e *Colletotrichum lindemuthianum*. O contrário foi observado em folhas de plantas de feijão infectadas por *Phaeoisariopsis griseola* e *Uromyces appendiculatus* (Jesus Junior et al., 2001).

As concentrações de pigmentos foram significativamente reduzidas para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas, contribuindo para a redução da taxa fotossintética. Os pigmentos fotossintéticos podem fornecer importantes informações sobre o status fisiológico das plantas. De acordo com Marengo e Lopes (2005), diversos estudos têm mostrado relações entre a concentração de clorofilas e a capacidade fotossintética.

A fluorescência de imagem tem sido utilizada no diagnóstico pré-sintomático de plantas sob estresse biótico e abiótico, tornando possível a detecção de alterações nos parâmetros antes mesmo de serem observados visualmente (Rolf e Scholes, 2010; Gorbe e Catalayud, 2012). Neste trabalho, os sintomas tornaram-se visualmente evidentes aos 9 dai (Fig. 6), porém as alterações nos parâmetros já puderam ser detectadas a partir dos 3 dai, principalmente para F_v/F_m (Fig. 5A), F_0 (Fig. 5C), NPQ (Fig. 5D), ETR (Fig. 5E) e qP (Fig. 5F). Somente F'_v/F'_m (Fig. 5B) mostrou alteração aos 9 dai.

Dentre os parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, F_v/F_m é um indicador do estresse da planta e é mensurado após a adaptação das plantas ao escuro por um determinado tempo. O valor da relação F_v/F_m reflete a eficiência quântica do FSII. Normalmente em plantas que não estão sob estresse, o parâmetro atinge valores em torno de 0,8, porém valores bem abaixo de 0,8 podem indicar danos fotoinibitórios no FSII (Araújo e Deminicis, 2009; Björkman e Powles, 1984). Todos os valores de F_v/F_m observados no presente estudo foram menores para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas, o que revela danos causados pela bactéria. O mesmo também foi observado em plantas de fumo infectadas por isolado virulento de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Iqbal et al., 2012).

A fluorescência inicial (F_0), cuja mensuração também ocorre após adaptação das plantas ao escuro, apresentou aumento com o progresso da mancha bacteriana. Este fato também foi verificado em folhas de plantas de eucalipto infectadas por

Puccinia psidii (Alves et al., 2011). Provavelmente este aumento em F0 está diretamente ligado a danos causados pela bactéria ao FSII, pois a energia absorvida pelas clorofilas ao invés de ser utilizada no processo fotoquímico pelo FSII passa a ser reemitida na forma de fluorescência, refletindo em aumento de F0.

O parâmetro F'_v/F'_m foi reduzido nas plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas indicando uma menor eficiência do FSII na captura de energia de excitação provenientes das clorofilas dos centros de reação. Essa redução de F'_v/F'_m também foi observada por Bonfing et al. (2006) em folhas de *Arabidopsis* infectadas por isolados virulentos e avirulentos de *P. syringae*.

A taxa de transporte de elétrons (ETR) também foi impactada em plantas inoculadas com *X. gardneri*, o que acabou por afetar o FSII e, conseqüentemente, reduzindo os valores de F'_v/F'_m .

O NPQ apresentou-se superior nas plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas. De acordo com Balachandran et al. (1997), em plantas sob estresse biótico, o aumento de NPQ indica que a capacidade de fotoproteção foi excedida e que juntamente com a fotoinibição contribuem para a degeneração do aparato fotossintético. Esses autores verificaram que plantas infectadas pelo vírus do mosaico do fumo tiveram sua capacidade e eficiência fotoquímica afetadas, o que refletiu em aumento de NPQ.

O qP foi menor para as plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas. Esse declínio provavelmente ocorreu porque a capacidade de fotoproteção do aparato fotossintético foi excedida. Esta redução de qP também foi observada em plantas de tomateiro infectadas por *F. o. f. sp. lycopersici* (Nogués et al. 2002).

Os resultados apresentados foram importantes em demonstrar a capacidade do patógeno *X. gardneri* em alterar significativamente os processos bioquímicos e fisiológicos analisados nas plantas de tomateiro infectadas, os quais foram claramente visualizados pela elevação da produção de ERO seguido pelo aumento da atividade enzimática, assim como a diminuição dos pigmentos fotossintéticos, dos parâmetros relacionados às trocas gasosas e alterações significativas na fluorescência da clorofila *a*.

REFERÊNCIAS

- Agrianual 2012. Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP.
- Alves AA, Guimarães LMS, Chaves ARM, DaMatta FM, Alfenas AC, 2011. Leaf gas Exchange and chlorophyll *a* fluorescence of *Eucalyptus urophylla* in response to *Puccinia psidii* infection. *Acta Physiologiae Plantarum* **33**, 1831-39.
- Anderson D, Prasad K, Stewart R, 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology* **109**, 1247-57.
- Anderson JV, Davis DG, 2004. Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in *Euphorbia esula*. *Physiologia Plantarum* **120**, 421-33.
- Apel K; Hirt H, 2004. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review Plant Biology* **55**, 373-99.
- Araújo ED, 2010. Competitividade entre espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha bacteriana do tomateiro. Brasília, Brasil: Universidade de Brasília, Dissertação (Mestrado).
- Araújo SAC, Deminicis BB, 2009. Fotoinibição da Fotossíntese. *Revista Brasileira de Biociências* **7**, 463-472.
- Balachandran S, Hurry VM, Kelley SE, Osmond CB, Robinson SA, Rohozinski J, Seaton GGR, Sims DA, 1997. Concepts of plant biotic stress. Some insights into the stress physiology of virus-infected plants, from the perspective of photosynthesis. *Physiologia Plantarum* **100**, 203-13.
- Badawi GH, Yamauchi Y, Shimada E, Sasaki R, Kawano N, Tanaka K, Tanaka K, 2004. Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts. *Plant Science* **166**, 919-28.
- Beauchamp C, Fridovich I, 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **44**, 276-87.
- Björkman O, Powles SB, 1984. Inhibition of photosynthetic reactions under water stress: interaction with light level. *Planta* **161**, 490-504.

Bonfing KB, Schreiber U, Gabler A, Roitsch T, Berger S, 2006. Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strain differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Planta* **225**, 1-12.

Cakmak L, Horst WJ, 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxide activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum* **83**, 463-68.

Carlberg C, Mannervik B, 1985. Glutathione reductase. *Methods Enzymology* **113**, 488-95.

Cavalcanti FR, Resende MLV, Lima JPMS, Silveira JAG, Oliveira JTA, 2006. Activities of antioxidant enzymes and photosynthetic responses in tomato pre-treated by plant activators and inoculated by *Xanthomonas vesicatoria*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **68**, 198-208.

Cavalcanti FR, Resende MVL, Oliveira JTA, 2007. Peroxidades ativadas por frações protéicas de extrato biológico eficaz na proteção do tomateiro contra a mancha bacteriana. *Fitopatologia Brasileira* **32**, 507-11.

Chaitanya KSK, Naithani SC, 1994. Role of superoxide lipid peroxidation and superoxide dismutase in membrane perturbation during loss of viability in seeds of *Shorea robusta* Gaertn . f. *New Phytologist* **126**, 623-27.

Chance B, Maehley AC, 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymology* **2**, 764-75.

Del Longo OT, González CA, Pastori GM, Trippi VS , 1993. Antioxidant defences under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant & Cell Physiol* **34**, 1023-28.

Demmig-Adams B, Adams W W, 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43**, 599-626.

Díaz CG, Bassanezi RB, Godoy CV, Lopes DB, Bergamin Filho, A, 2001. Quantificação do efeito do cretamento bacteriano comum na eficiência fotossintética e na produção do feijoeiro. *Fitopatologia Brasileira* **26**, 71-76.

Fernández-Ocaña A, Chaki M, Luque F, Gómez-Rodríguez MV, Carreras A, Valderrama R, Begara-Morales JC, Hernández LE, Corpas FJ, Barroso JB, 2011.

Functional analysis of superoxide dismutases (SODs) in sunflower under biotic and abiotic stress conditions. Identification of two new genes of mitochondrial Mn-SOD. *Plant Physiology* **168**, 1303-08.

Foyer CH, Halliwell B, 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**, 21-25.

Gay C, Gerbicki JM, 2000. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylene orange hydroperoxide assay. *Analytical Biochemistry* **284**, 217-20.

Gayoso C, Pomar F, Merino F, Bernal MA, 2004. Oxidative metabolism and phenolic compounds in *Capsicum annuum* L. var. *annuum* infected by *Phytophthora capsici* Leon. *Scientia Horticulturae* **102**, 1-13.

Giannopolitis CN, Ries SK, 1977. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology* **59**, 309-14.

Good MJ, Sasser M, 1980. Prevention - the key to controlling bacterial spot and bacterial speck of tomato. *Plant Disease* **64**, 831-34.

Gorbe E, Calatayud A, 2012. Applications of chlorophyll fluorescence imaging technique in horticultural research: A review. *Scientia Horticulturae* **138**, 24-35.

Guo DP, Guo YP, Zhao JP, Liu H, Peng Y, Wang QM, Chen JS, Rao GZ, 2005. Photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in leaves of stem mustard (*Brassica juncea* var. *tsatsai*) after turnip mosaic virus infection. *Plant Science* **168**, 57-63.

Heath RL, Packer L, 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **125**, 189-98.

Iqbal MJ, Goodwin PH, Leonardos ED, Grodzinski B, 2012. Spatial and temporal changes in chlorophyll fluorescence images of *Nicotiana benthamiana* leaves following inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Plant Pathology Online* [<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3059.2012.02592.x/pdf>]

Jesus Junior WC, Vale FXR, Martinez CA, Coelho RR, Costa LC, Hau B, Zambolim L, 2001. Effects of angular leaf spot and rust on leaf gas Exchange and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Photosynthetica* **39**, 603-60.

- Jones JB, Lacy GH, Bouzar H, Stall RE, Schaad NW, 2004. Reclassification of the Xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato pepper. *Systematic and Applied Microbiology* **27**, 755-62.
- Jones JB, Jones JP, Stall RE, Zitter TA, eds, 1993. Compendium of Tomato Diseases. St. Paul: The American Phytopathological Society.
- Jones JB, Stall RE, Bouzar H, 1998. Diversity among xanthomonads pathogenic on pepper and tomato. *Annual Review Phytopathology* **36**, 41-58.
- Kado CI, Heskett, MG, 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* **60**, 969-79.
- Kar M, Mishra D, 1976. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* **57**, 315-19.
- Krause GH, Weis E, 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**, 313-49.
- Kuo MC, Kao CH, 2003. Aluminium effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. *Biologia Plantarum* **46**, 149-52.
- Kuzniak E, Sklodowska M, 2005. Fungal pathogen-induced changes in the oxidant systems of leaf peroxisomes from infected tomato plants. *Planta* **222**, 192-200.
- Lamb C, Dixon RA, 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology* **48**, 251-75.
- Lichtenthaler HJ, Miehe JA, 1997. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends in Plant Science* **2**, 316-20.
- Lopes CA, Quezado-Duval MA, 2005. Doenças Bacterianas. In: Lopes CA, Ávila CA. Doenças do Tomateiro. EMBRAPA-CNPQ.
- Lorenzini G, Guidi L, Nali C, Ciompi, Soldatini GF, 1997. Photosynthetic response of tomato plants to vascular wilt diseases. *Plant Science* **124**, 143-52.
- Lopes DB, Berger RD, 2001. The effects of rust and anthracnose on the photosynthetic competence of diseased bean leaves. *Phytopathology* **91**, 212-20.
- Mandal S, Mitra A, Mallick N, 2008. Biochemical characterization of oxidative burst during interaction between *Solanum lycopersicum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **72**, 56-61.

- Marenco RA, Lopes NF, 2005. Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Viçosa.
- Medhy MC , 1994. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiology* **105**, 467-72.
- Mittler R, 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7(9)**, 405-10.
- Nagalakshmi N, Prasad MNV, 2001. Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Science* **160**, 291-99.
- Nakano Y, Asada K, 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant & Cell Physiology* **22**, 867-80.
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT, 2002. Hydrogen, peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1237-47.
- Nogués S, Cotxarrera L, Alegre L, Trillas MI, 2002. Limitations to photosynthesis in tomato leaves induced by *Fusarium* wilt. *New Phytologist* **154**, 461-70.
- Quezado-Duval AM, Leite RP, Truffi D, Camargo LEA, 2004. Outbreaks of bacterial spot caused by *Xanthomonas gardneri* on processing tomato in central-west Brazil. *Plant Disease* **88**, 157-61.
- Resende MLV, Salgado SML, Chaves ZM, 2003. Reactive oxygen species on plant defense responses to pathogens. *Fitopatologia Brasileira* **28**, 123-130.
- Ribeiro RV, 2002. Influência da temperatura na fotossíntese de laranjeira ‘Pêra’ com clorose variegada dos citros. Piracicaba, Brasil: Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Dissertação (Mestrado).
- Rolfé SA, Scholes JD, 2010. Chlorophyll fluorescence imaging of plant-pathogen interactions. *Protoplasma* **247**, 163-75.
- Rodrigues Neto J, Sugimori MH, Malavolta Júnior VA, 1984. Raças de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye, no Estado de São Paulo. Arquivos do Instituto Biológico **51**, 13-16.
- Santos VR, Barbosa RAB, 2011. Produção de Tomate Orgânico. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas - SBRT. [<http://www.respostatecnica.org.br/dossies-tecnicos>]. Acesso em 08 Julho de 2012.

Shtienberg D, 1992. Effects of foliar diseases on gas exchange processes: A comparative study. *Phytopathology* **82**, 760-65.

Taiz L, Zeiger E, 2005. *Fisiologia Vegetal*. Porto Alegre: Artmed

Tang L, Knon SY, Kim SH, Kim JS, Choi JS, Cho KY, Sung CK, Kwak SS, Lee HS, 2006. Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature. *Plant Cell Reports* **25**, 1380-86.

Wang B, Lüttge U, Ratajczak R, 2004. Specific regulation of SOD isoforms by NaCl and osmotic stress in leaves of the C₃ halophyte *Suaeda salsa* L. *Journal of Plant Physiology* **161**, 285-93.

Wojtaszek P, 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Journal Biochemistry* **322**, 618-92.

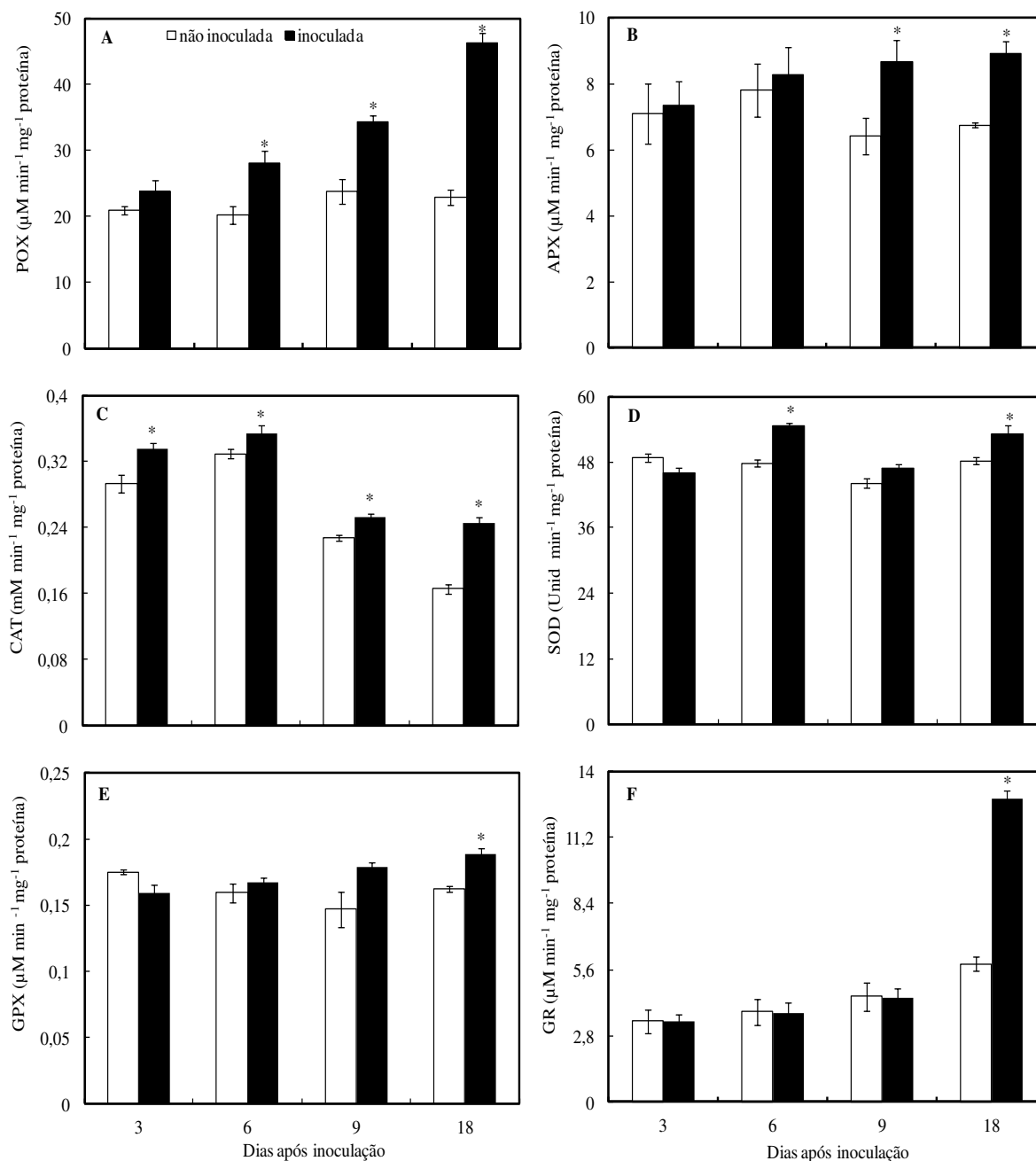


Figura 1. Atividade das enzimas peroxidase (POX) (A), ascorbato peroxidase (APX) (B), catalase (CAT) (C), superóxido dismutase (SOD) (D), glutaciona peroxidase (GPX) (E) e redutase da glutaciona (GR) (F) em folhas de plantas de tomateiro não inoculadas e inoculadas com *Xanthomonas gardneri*. Médias dos tratamentos plantas não inoculadas e plantas inoculadas seguidas por um asterisco (*), em cada época de avaliação, diferem pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade. O desvio padrão da média está representado em cada barra.

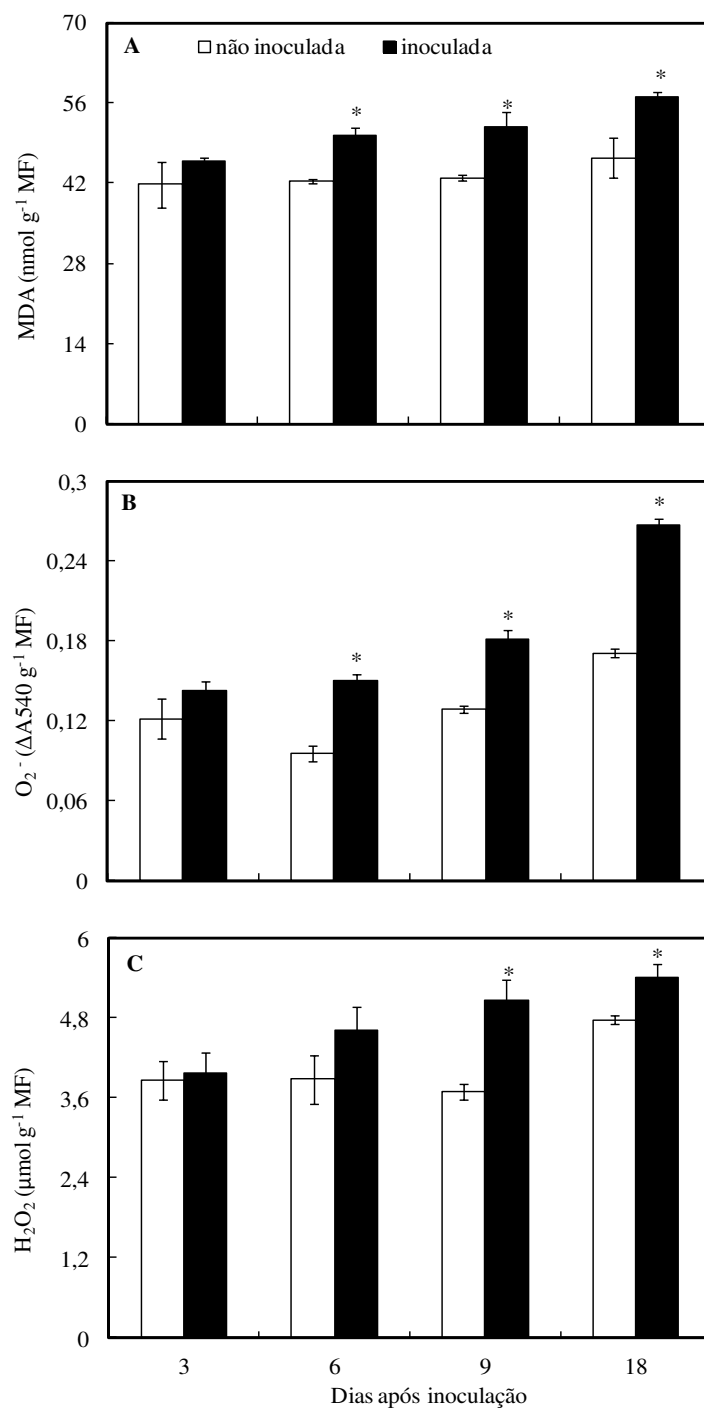


Figura 2. Concentrações de aldeído malônico (MDA) (A), de ânion superóxido (O₂⁻) (B) e de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (C) em folhas de plantas de tomateiro não inoculadas e inoculadas com *Xanthomonas gardneri*. Médias dos tratamentos plantas não inoculadas e plantas inoculadas seguidas por um asterisco (*), em cada época de avaliação, diferem pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade. O desvio padrão da média está representado em cada barra. MF = massa fresca.

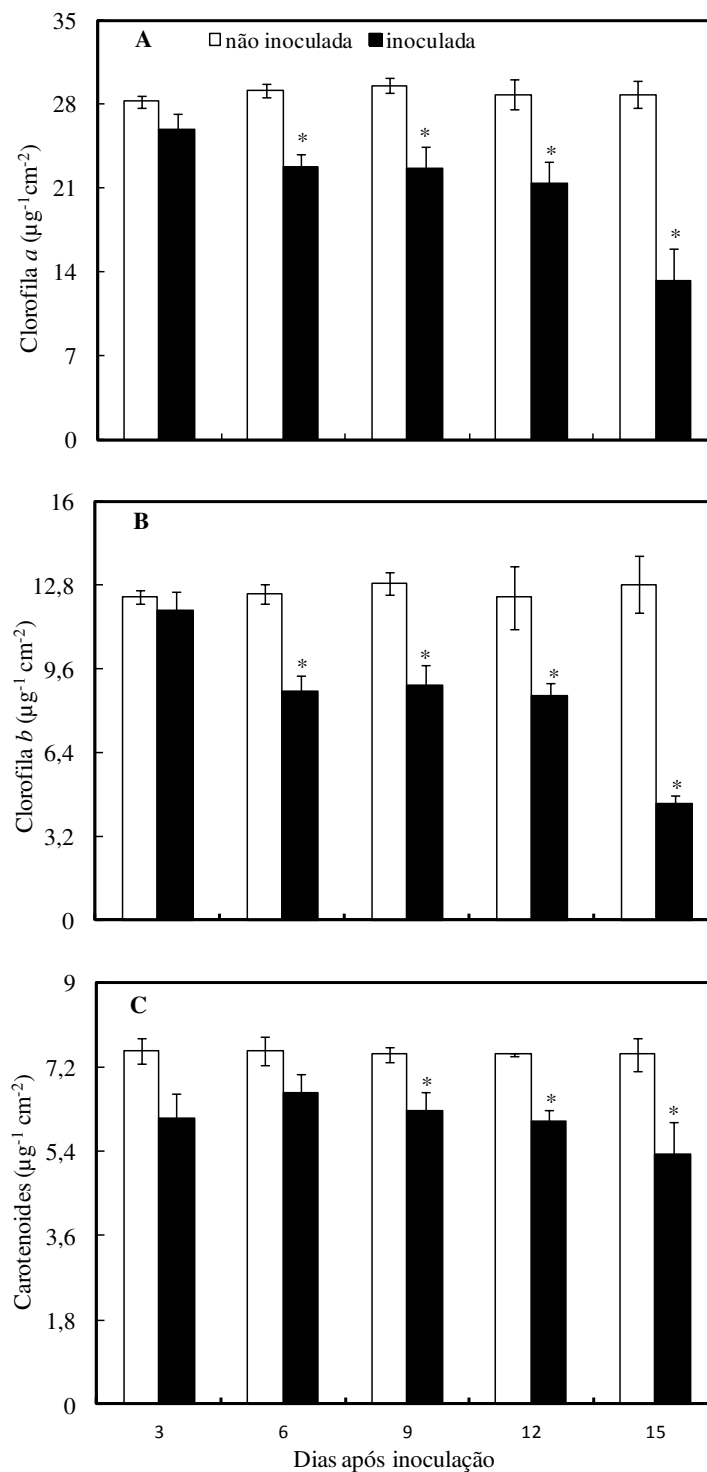


Figura 3. Concentrações de clorofila *a* (A), de clorofila *b* (B) e de carotenoides (C) em folhas de plantas de tomateiro não inoculadas e inoculadas com *Xanthomonas gardneri*. Médias dos tratamentos plantas não inoculadas e plantas inoculadas seguidas por um asterisco (*), em cada época de avaliação, diferem pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade. O desvio padrão da média está representado em cada barra.

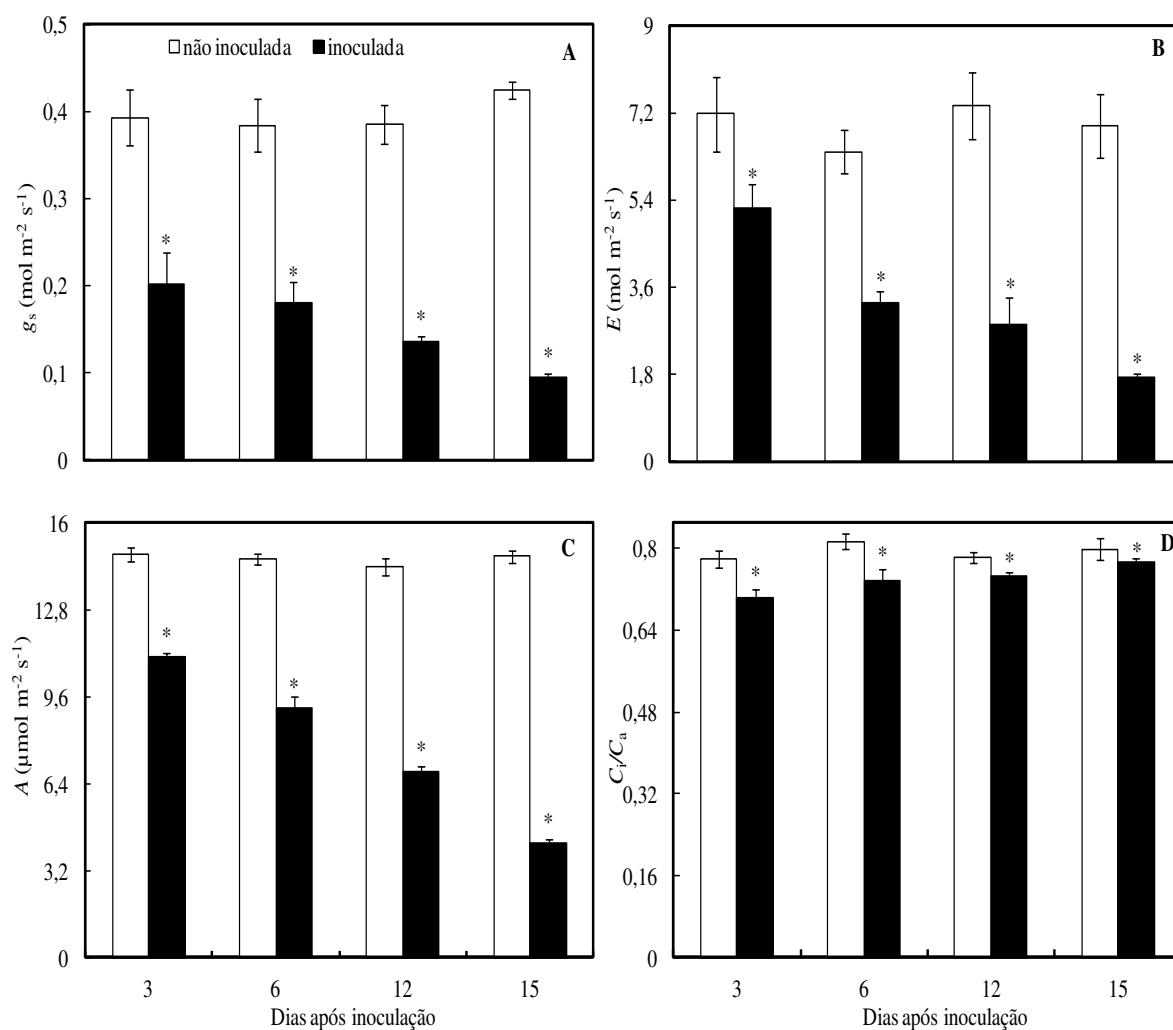


Figura 4. Condutância estomática (g_s) (A), transpiração (E) (B), taxa de assimilação líquida de CO_2 (A) (C) e relação entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) (D) determinadas em folíolos de plantas de tomateiro não inoculadas e inoculadas com *Xanthomonas gardneri*. Médias dos tratamentos plantas não inoculadas e plantas inoculadas seguidas por um asterisco (*), em cada época de avaliação, diferem pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade. O desvio padrão da média está representado em cada barra.

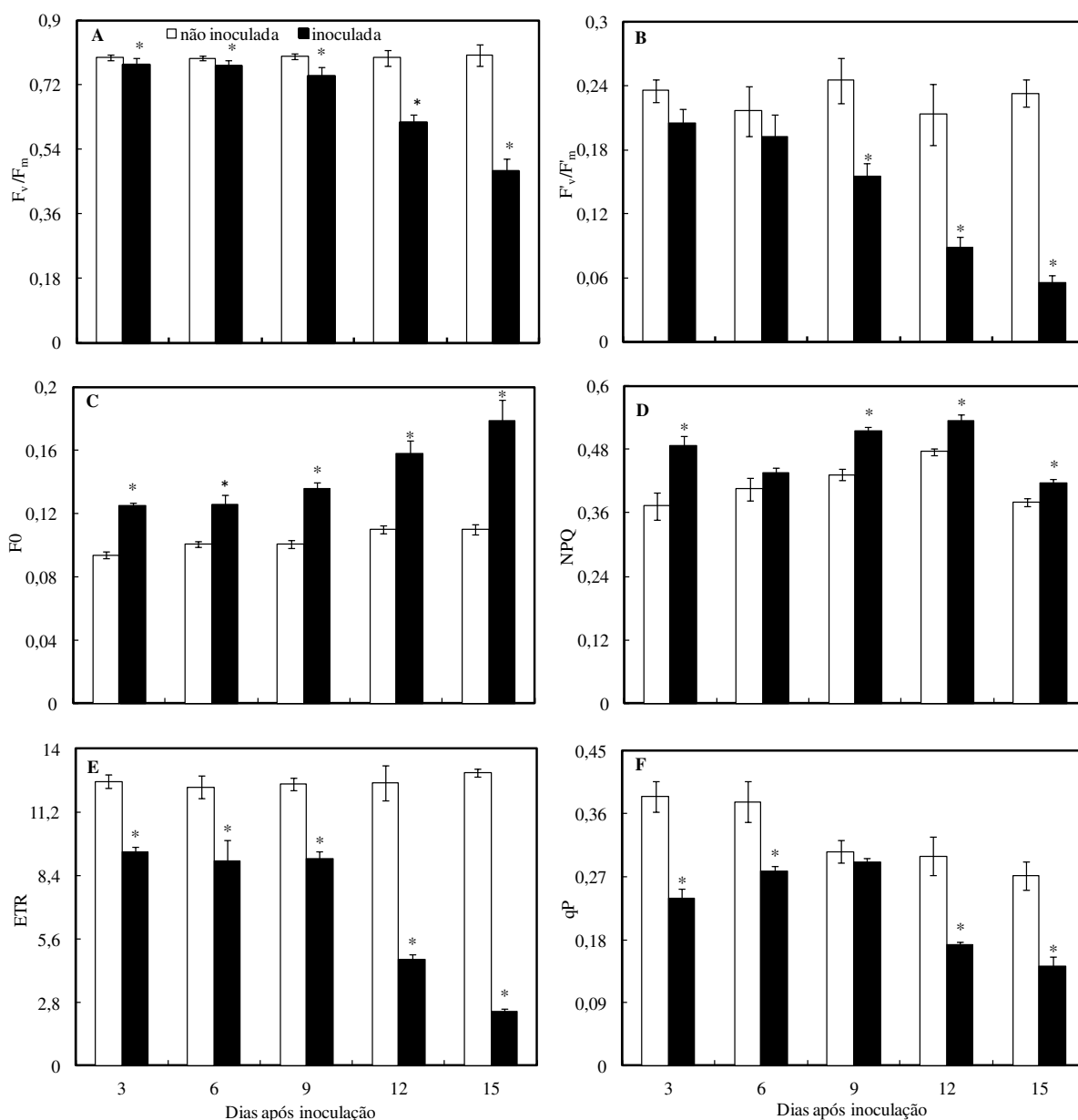


Figura 5. Rendimento quântico máximo do fotossistema II (FSII) (F_v/F_m) (A), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (FSII) (F'_v/F'_m) (B), fluorescência inicial (F_0) (C), quenching não-fotoquímico (NPQ) (D), taxa de transporte de elétrons (ETR) (E) e quenching fotoquímico (qP) determinadas em folíolos de plantas de tomateiro não inoculadas e inoculadas com *Xanthomonas gardneri*. Médias dos tratamentos plantas não inoculadas e plantas inoculadas seguidas por um asterisco (*), em cada época de avaliação, diferem pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade. O desvio padrão da média está representado em cada barra.

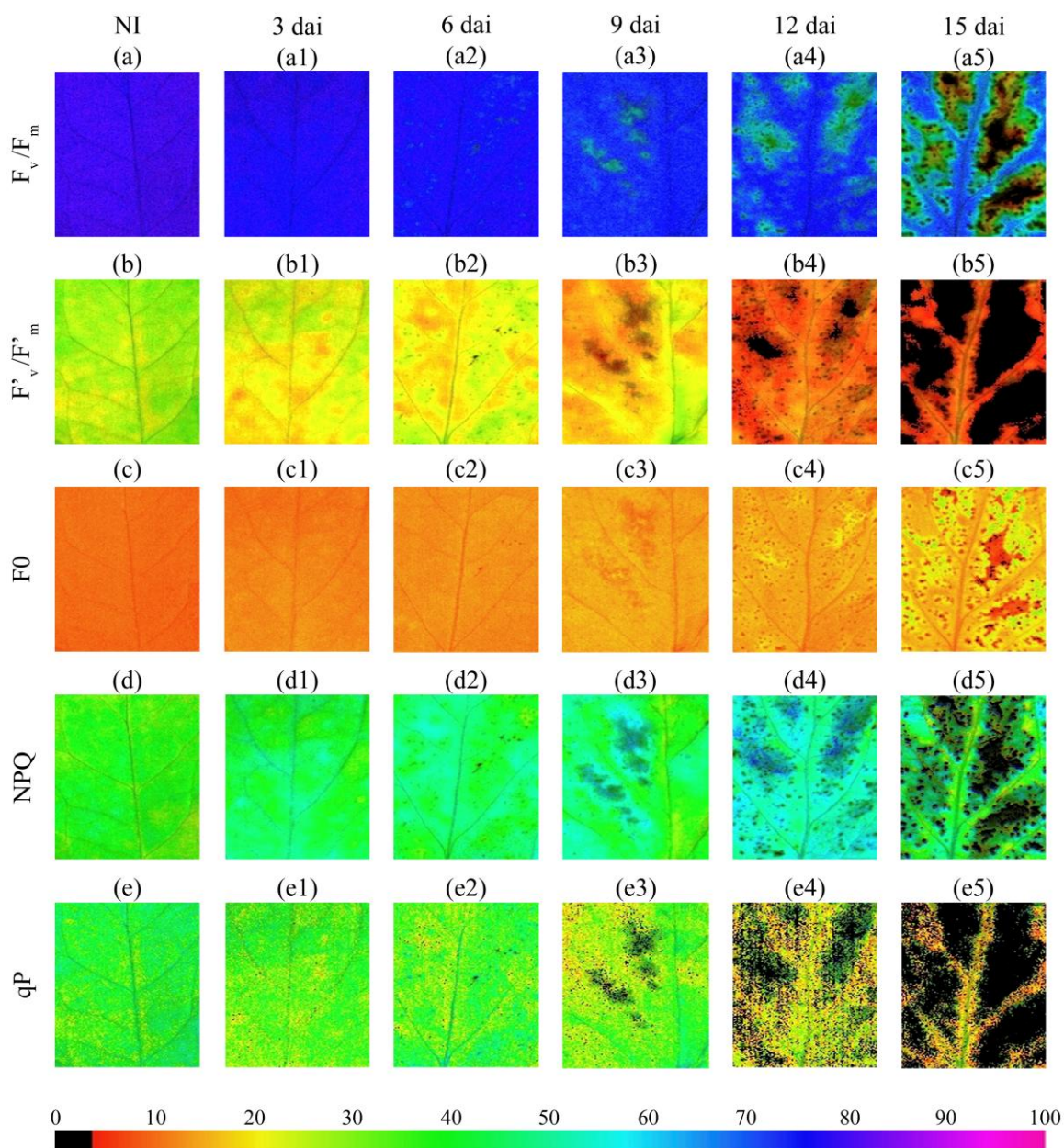


Figura 6. Imagens de fluorescência da clorofila *a* obtidas de folíolos de plantas de tomateiro não inoculados (NI) e inoculados com *Xanthomonas gardneri* aos 3, 6, 9, 12 e 15 dias após inoculação. Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* avaliados foram o rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m) em folíolos não inoculados (a) e inoculados (a1-a5); rendimento quântico efetivo do fotossistema II (F'_v/F'_m) em folíolos não inoculados (b) e inoculados (b1-b5); fluorescência inicial (F_0) em folíolos não inoculados (c) e inoculados (c1-c5); quenching não-fotoquímico (NPQ) em folíolos não inoculados (d) e inoculados (d1-d5) e quenching fotoquímico (qP) em folíolos não inoculado (e) e inoculados (e1-e5).